培養したウシの卵子と初期胚におけるグリコゲン顆粒の組織化学的観察

新村　末雄

（平成7年9月1日受付）

要約　卵核胞期のウシの卵胞卵子，卵胞卵子を体外で成熟させた未受精卵子とこれを体外で受精させたのち培養して発生させた精子侵入期の卵子から孵化胚盤胞期までの胚について，グリコゲン含量と α-Glycerophosphate dehydrogenase （α-GDH）活性を組織化学的に調べた。グリコゲン顆粒は，1細胞期の卵子から拡張胚盤胞期までの胚では細胞質に常に多量含まれていたが，孵化胚盤胞では減少した。また α-GDH 活性は，1細胞期の卵子から拡張胚盤胞期までの胚では中等度であったが，孵化胚盤胞では弱かった。

キーワード：ウシ，培養卵子，培養初期胚，グリコゲン顆粒，組織化学

緒　　言

一般に，哺乳動物の卵子は初期発生のためのエネルギー源として，細胞質にグリコゲン顆粒や脂質小滴を蓄積していることが知られている[1,2]。なお，その量は動物種によって異なっており，ウシ，ヒツジ，ヤギ，ブタおよびイヌの胞状卵胞内卵子はグリコゲンは少なく脂質を多量に含んでいるが，マウス，ラットおよびハムスターの卵子はグリコゲンを多量に含んでいるという。また，ウサギの卵子はグリコゲンと脂質をともに多量に含んでいるといわれている。さらに，排卵してから着床するまでの発生初期胚についても，グリコゲン含量の消長がブタ[3]，ウサギ[3]，ラット[4]，マウス[5]，ハムスター[6]，スナネズミ[7]，ハタネズミ[8]およびマストミス[9]で，脂質含量の消長がハタネズミ[8]，マストミス[9]，ブタ[10]，ウサギ[10]，モルモット[10]，ラット[10]，マウス[10]，ハムスター[10]およびスナネズミ[11]で調べられている。

一方ウシについては，脂質含量が卵胞卵子[1]および体外受精卵子を培養して得られた初期胚[12]で調べられているが，グリコゲンについては卵胞卵子[2,13,14]で存在が確かめられているのみであり，グリコゲンが初期胚に存在しているのかどうか，また，初期発生の過程で含量がどのように変化するのかは不明である。

グリコゲンは胚の発生のためのエネルギー源として重要な役割を持っているので，卵子と初期胚に含まれるグリコゲンの量的変化を明らかにすることは，卵子と初期胚の物質代謝を論ずるうえで重要なことと思われる。

本実験は，卵核胞期のウシの卵胞卵子，卵胞卵子を体外で成熟させた未受精卵子とこれを体外で受精させたのち培養して発生させた1細胞期の精子侵入卵子から孵化胚盤胞期までの初期胚について，グリコゲンの組織化学的検出を行い，グリコゲン含量の発生過程に伴う変化を調べたものである。併せて，糖と脂質の相互転換に役割を果たす α-Glycerophosphate dehydrogenase（α-GDH）の活性についても組織化学的検出を試み，発生過程に伴う変化を調べた。

材料および方法

卵子の採取と体外受精

黒毛和種およびホルスタイン種の卵巣を屠場から持ち帰り，直径2ないし5 mmの小型胞状卵胞から，卵丘細胞に囲まれた卵子を吸引採取した。採取した卵子は，1 ml中に200単位のペニシリンGカリウム（明治製菓）を含むリン酸緩衝塩類溶液[15]（PBS, pH 7.4）で洗浄した後，ウシ胎仔血清（FCS, Gibco Lab., NY, U. S. A.）を10％含む TCM-199（Gibco Lab.）で2回洗浄した。次いで，洗浄した卵子の中から細胞質が均一で卵丘細胞が密に付着しているものを選び，表面をミネラルオイル（Squibb and Sons, Inc., NJ, U. S. A.）で覆ったFCS

を10％含む TCM-199で，39℃で CO_2 5％，空気95％の気相下で22時間培養して成熟させた。

体外受精

黒毛和種およびホルスタイン種の凍結精液を融解後，ウシ血清アルブミン(BSA)を含まず，10mM のカフェイン（和光純薬）および1 ml 中にヘパリン（Sigma Chemical Co., MO, U. S. A.）を10μg 含む BRACKETT と OLIPHANT の液[16]（BO 液）で精子を洗浄し，精子濃度が 5×10^6個/ml になるように10mM のカフェインと1％の BSA（Sigma Chemical Co.）を含む BO 液で希釈し，ミネラルオイルで覆った。体外受精は，上述の精子希釈液に体外成熟させた卵子を移し，39℃で CO_2 5％，空気95％の気相下で6時間培養して行った。

受精卵子の体外培養

体外受精後，卵丘細胞に囲まれた受精卵子を10％の FCS を含む TCM-199（発生用培養液）で3回洗浄した後，発生用培養液で，39℃で CO_2 5％，空気95％の気相下で48時間培養して2細胞胚に発生させた。この時期に，胚の周囲に付着している卵丘細胞をピペット操作により除去した。卵丘細胞を除去した胚は，ミネラルオイルで覆った発生用培養液の小滴中において，単層に増殖した卵丘細胞上で，39℃で CO_2 5％，空気95％の気相下で8日間培養した。培養液は48時間毎に新しいものと交換した。

観察に用いた卵子は1細胞期（採取直後の卵核胞期，体外成熟後の未受精期および媒精後6時間の精子侵入期）のもので，胚は2細胞期（媒精後2日），4細胞期（2ないし3日），8ないし16細胞期（3ないし4日），桑実胚期（5ないし6日），初期胚盤胞期（7ないし8日），拡張胚盤胞期（8ないし9日）および孵化胚盤胞期（10日）のものである。

グリコゲンの検出

採取した1細胞卵子は0.25％のトリプシンと0.04％の EDTA を含む PBS に浸漬して，卵丘細胞を除去した。また，すべての時期の卵子と胚は，0.2％のプロナーゼ（Sigma Chemical Co.）を含む PBS に浸漬して，透明帯を除去した。透明帯を除去した卵子と胚は，PBS で洗浄後，ジェンダ液に固定した。グリコゲンを検出するために，これらの卵子と胚に過沃素酸シッフ（PAS）反応（唾液消化試験併用）[17]を施した。

α-GDH 活性の検出

α-GDH 活性を検出するために，BARKA と ANDERSON の方法[18]に従って作成した基質液に卵子と胚を浸漬した。基質液の組成は，α-グリセロリン酸ナトリウム 216.0mg, NAD 4.0mg, 塩化マグネシウム 4.8mg, nitro-BT 10.0 mg, 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）9.0 ml で，基質液の pH は最終的に7.2に調整した。卵子および胚の基質液への浸漬は，37℃で60ないし80分間行った。なお対照として，基質を含まない液に浸漬した卵子と胚を使用した。

PAS 反応を施した卵子と胚，および α-GDH 活性検出のための基質液に浸漬した卵子と胚は，あらかじめワセリン・パラフィンのスポットをカバーグラスの四隅に位置するように置いたスライドグラスの中央に移し，カバーグラスをかぶせ静かに押して卵子と胚を圧し，顕微鏡下で観察した。観察した卵子および胚の数は，グリコゲン顆粒検出と α-GDH 活性検出のために1発生時期についてそれぞれ10ないし15個であった。なお，退行した卵子と胚は観察から除外した。

結　　果

グリコゲン含量

培養したウシの卵子と初期胚に PAS 反応を施すと，細胞質に赤紫色の顆粒が出現した（図1－4）。この顆粒は唾液消化試験によって消失したので，グリコゲンであることが確認された。表1に示したように，グリコゲン顆粒は1細胞期の卵子から拡張胚盤胞期までの胚では多量含まれていたが(図1－3)，孵化胚盤胞では少量であった（図4）。

α-GDH 活性

培養したウシの卵子と初期胚を BARKA と ANDERSON の方法[18]に従って処置すると，観察したすべての時期の卵子と胚の細胞質にジホルマザン顆粒の沈着が認められた(図5，6)。この顆粒は基質を除いた液に浸漬した卵子と胚にはみられなかったので，この顆粒が α-GDH 活性を現していることが確認された。卵子と初期胚において，ジホルマザン顆粒は割球および細胞の細胞質全域に分布していたが，初期胚では，ジホルマザン顆

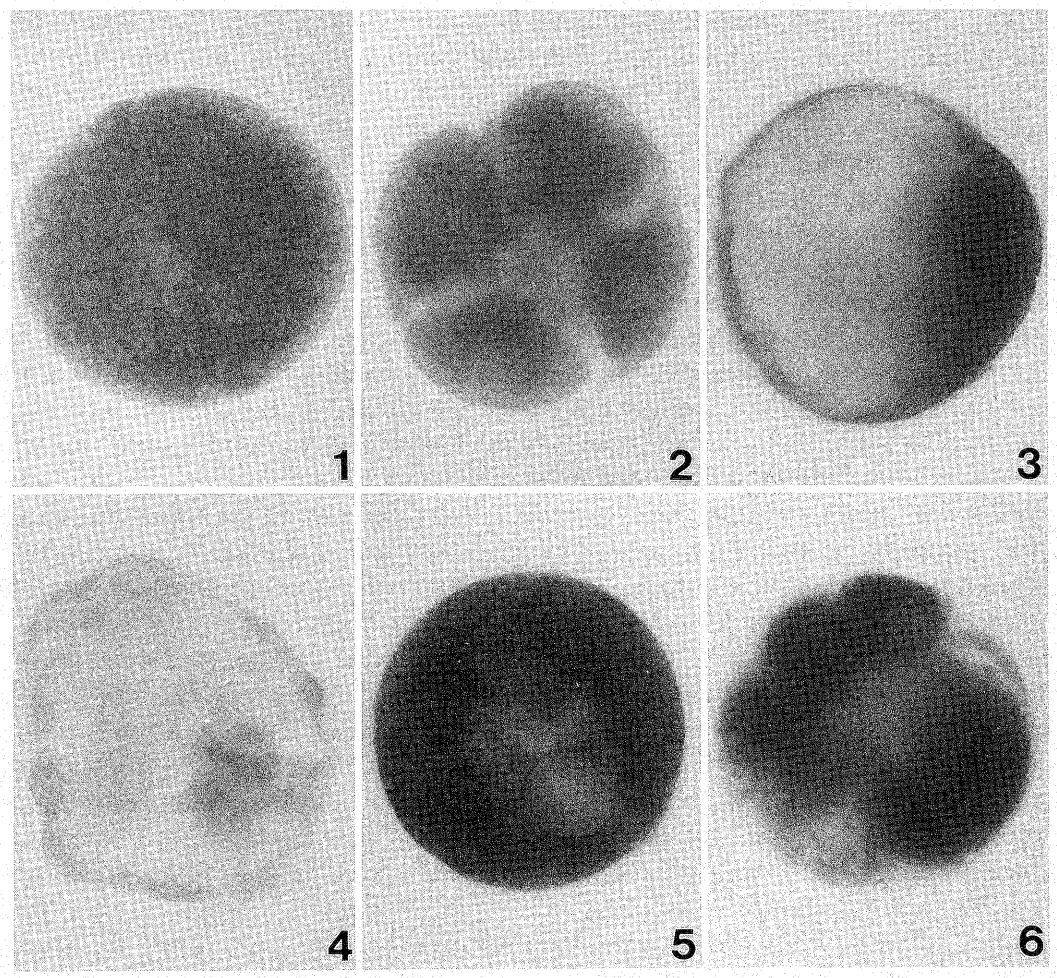

Fig. 1. Glycogen granules in an 1-cell bovine egg at the sperm-penetrated stage (PAS method). ×300.
Fig. 2. Glycogen granules in a 4-cell bovine embryo (PAS method). ×300.
Fig. 3. Glycogen granules in an expanded bovine blastocyst (PAS method). ×300.
Fig. 4. Glycogen granules in a hatched bovine blastocyst (PAS method). ×300.
Fig. 5. α-GDH activity in an 1-cell bovine egg at the germinal vesicle stage (BARKA and ANDERSON method). ×300.
Fig. 6. α-GDH activity in an 8-cell bovine embryo (BARKA and ANDERSON method). ×300.

Table 1. The amount of glycogen and the activity of α-GDH in cultured bovine eggs fertilized, and embryos developed in vitro

	Developmental stages									
	1-Cell			2-Cell	4-Cell	8- to 16-Cell	Morula	Blastocyst		
	Germinal vesicle	Unfertilized	Sperm-penetrated					Early	Expanded	Hatched
Glycogen	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
α-GDH	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+

The amount of glycogen: ++ large, + small. The activity of α-GDH: ++ moderate, + weak.

粒の沈着量は割球あるいは細胞によって異なっていた。表1に示したように，α-GDH 活性は1細胞期の卵子から拡張胚盤胞期までの胚では中等度であったが，孵化胚盤胞では弱かった。

考　　察

ウシにおいて，二次卵胞と胞状卵胞の卵子はグリコゲン顆粒を含有していることが組織化学的に確かめられており[2,13,14]，卵子のグリコゲン含量は卵胞の発育に伴って増加するといわれている[13]。また，胞状卵胞内卵子のグリコゲンは細胞質全域に分布する小胞の中にみられることが電子顕微鏡による観察から明らかにされている[14]。しかしこれまでに，ウシの初期胚がグリコゲンを含有しているのかどうかは全く調べられておらず，初期発生の過程におけるグリコゲン含量の変化は不明である。

本実験において，1細胞期の卵子から胚盤胞期までの初期胚についてグリコゲンの検出を組織化学的に試みたところ，グリコゲンは卵核胞期の卵胞卵子から拡張胚盤胞期までの胚に常に多量含まれていたが，孵化胚盤胞では少なかった。このようなグリコゲン含量の発生に伴う変動は，ラット[4]，マウス[5]，ハムスター[6]およびスナネズミ[7]の卵子と胚におけるものと同様であったので，ウシの卵子と胚は，これらの動物のものと同様のグリコゲン代謝を行っていることがうかがわれた。

α-GDH は，糖と脂質の相互転換に役割を果たすもので，スナネズミ[11]，マウス[19,20]，ハムスター[21]およびウサギ[22]の卵子と初期胚で活性が検出されている。ウシの卵子と初期胚を用いた本実験において，この酵素の活性は1細胞期の卵子から胚盤胞期までの初期胚でみられた。このことから，ウシの卵子と初期胚は発生過程を通して糖と脂質の相互転換を行っていることが推察された。

本実験の培養したウシの卵子と胚において，グリコゲン含量は未受精期から拡張胚盤胞期の間でほとんど変動しないことが明らかとなった。この時期の卵子と胚のグリコゲン含量が変化しなかったことの理由については，培養したウシの卵子と初期胚は脂質を多量に細胞質に蓄積していることが知られているので[12]，この脂質を発生のためのエネルギー源として利用しているためか，あるいは，この時期の卵子と胚がグリコゲンを発生のためのエネルギー源として使用しているものの，α-GDH によって糖が常に脂質から転換されて補充されているためと思われた。一方，孵化胚盤胞ではグリコゲン含量が減少したが，これは胚盤胞がハッチングのためのエネルギー源として相当量のグリコゲンを消費したためと思われた。

謝　　辞

稿を終わるにあたり，ウシの卵巣を提供していただいた新潟市食肉衛生検査所の皆様に深謝致します。

引用文献

1. ISHIDA, K. 1960. Histochemical studies of lipids in the ovaries of domestic animals. Arch. histol. jap., **19**: 547-563.
2. ISHIDA, K. 1954. Morphology and cytochemistry of ovaries of domestic animals. Tohoku J. Agr. Res., **4**: 197-211.
3. ISHIDA, K. 1963. Histochemical studies of the tubal ova of rabbits and pigs. Jap. J. Fert. Ster., **8**: 11-17.
4. ISHIDA, K. 1954. Cytochemical studies of tubal ova. Tohoku J. Agr. Res., **5**: 1-11.
5. THOMSON, J. L. and R. L. BRINSTER. 1966. Glycogen content of preimplantation mouse embryos. Anat. Rec., **155**: 97-102.
6. PARKENING, T. A. and A. L. SODERWALL. 1974. Histochemical localization of glycogen in preimplantation and implantation stages of young and senescent golden hamsters. J. Reprod. Fert., **41**: 285-295.
7. 新村末雄・佐藤栄治・石田一夫. 1978. スナネズミの卵子におけるグリコゲン，ホスホリラーゼおよびUDPG グリコゲントランスフェラーゼの組織化学的研究. 家畜繁殖誌，**24**：181-183.
8. 新村末雄・今村憲吉・後藤信男・石田一夫. 1987. ハタネズミ（*Microtus montebelli*）の卵胞卵と発生初

期胚におけるタンパク質，多糖類および脂質の組織化学的観察．家畜繁殖誌，**33**：6-10．

9. 新村末雄・藤沢信義・佐藤徳光・石田一夫．1991．マストミス（*Praomys natalensis*）の卵胞卵と発生初期胚におけるタンパク質，多糖類及び脂質の組織化学的観察．家畜繁殖誌，**37**：65-69．
10. 新村末雄・石田一夫．1980．発生初期の哺乳動物卵子における脂肪小滴の組織化学的観察．家畜繁殖誌，**26**：46-49．
11. 新村末雄・佐藤栄治・石田一夫．1978．スナネズミの卵子における脂肪及び関連酵素の組織化学的研究．家畜繁殖誌，**24**：147-148．
12. 新村末雄・四谷伊公子・柳　在雄・松本浩道・菅原七郎．1995．培養したウシの卵子と初期胚における脂質の組織化学的観察．新大農研報，**47**：45-51．
13. MOSS, S., T. R. WRENN and J. F. SYKES. 1954. Some histological and histochemical observations of the bovine ovary during the estrous cycle. Anat. Rec., **120**: 409-433.
14. FLEMING, W. N. and R. G. SAACKE. 1972. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. J. Reprod. Fert., **29**: 203-213.
15. DULBECCO, R. and M. VOGT. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med., **99**: 167-182.
16. BRACKETT, B. G. and G. OLIPHANT. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., **12**: 260-274.
17. MCMANUS, J. F. A. 1948. Histological and histochemical use of periodic acid. Stain Technol., **23**: 99-108.
18. BARKA, T. and P. J. ANDERSON. 1965. Histochemistry. Hoeber Medical Division, Harper and Row, Publishers, Inc., New York, Evanston and London. pp. 296-333.
19. LIN, C. H., C. F. HUANG and T. K. CHANG. 1964. Histochemical changes in mouse eggs before and after fertilization and during their early development. 1. Dehydrogenases. Acta Biol. Exp. Sinica, **9**: 281-289.
20. SKINNER, A. and R. G. SPECTOR. 1968. Enzyme histochemical reactions of mouse ova. Experientia, **24**: 905-906.
21. ISHIDA, K. 1969. Enzyme-histochemical studies of mammalian eggs during the early development. Jap. J. Fert. Ster., **14**: 126-135.
22. SUGAWARA, S. and E. S. E. HAFEZ. 1967. Developmental changes in dehydrogenase activities in rabbit eggs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **126**: 849-853.

Histochemical Observations of Glycogen Granules in Cultured Bovine Eggs and Embryos during the Early Development

Sueo NIIMURA

(Received September 1, 1995)

Summary

The amount of glycogen granules and the activity of α-glycerophosphate dehydrogenase (α-GDH) were histochemically examined in bovine eggs matured in vitro, and in embryos from the 2-cell to hatched blastocyst stages developed in vitro. For the demonstration of glycogen, eggs and embryos were treated with the periodic acid-Schiff with or without a preceding salivary test. The activity of α-GDH was demonstrated by the method of BARKA and ANDERSON. The amount of glycogen granules was abundant in 1-cell eggs at the germinal vesicle, unfertilized and sperm-penetrated stages, and in embryos from the 2-cell to expanded blastocyst stages, but less in hatched blastocysts. The activity of α-GDH was moderate in eggs and embryos at the stages from 1-cell to expanded blastocyst, but weak in hatched blastocysts.

key words: cow, cultured egg, cultured embryo, glycogen granule, histochemistry